

AKTIVITAS PROTEASE DAN GAMBARAN HISTOLOGI GINJAL TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) PASCA INDUKSI *Cyclosporine-A*

Ira Perdana Wati, Aulanni'am*, Chanif Mahdi

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya,
Jl. Veteran Malang 65145

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email: aulani@ub.ac.id

ABSTRAK

Protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Aktivitas protease merupakan kemampuan enzim protease untuk memecah protein. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas protease dan gambaran histologi pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) pasca induksi *Cyclosporine-A* (CsA). Ginjal yang digunakan berasal dari dua kelompok, yaitu kelompok tikus kontrol dan tikus induksi CsA dengan dosis 3 mg/kg per berat badan tikus. Aktivitas protease diukur untuk Spektrofotometri UV dan gambaran histologi dengan metode pewarnaan HE (*Hematoksilin-Eosin*). Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata aktivitas protease tikus pasca induksi CsA meningkat yaitu $0,181 \pm 0,005$ dan pasca induksi CsA $0,283 \pm 0,009$ $\mu\text{mol/mL} \cdot \text{menit}$. Pada gambaran histologi menunjukkan adanya perbedaan sel epitel antara tikus kontrol dan tikus induksi CsA. Inti sel pada tikus induksi CsA meruncing dibandingkan dengan tikus kontrol karena mengalami fibrosis.

Kata kunci: aktivitas protease, *Cyclosporine-A*, ginjal, *Hematoksilin-Eosin*

ABSTRACT

Protease is enzymes that hydrolyze peptide bonds in proteins. Protease activity is the ability of protease enzymes to break down proteins. The studies aimed to determine protease activity and histological kidney rats (*Rattus norvegicus*) after induction of *Cyclosporine-A* (CSA). Kidneys used from two groups, control rats and rats with CSA induction dose of 3 mg/kg body weight of rats. Protease activity using UV spectrophotometry and histology staining using HE (*Hematoxylin-Eosin*). The results of this research indicate that protease activity of mice after induction of protease CSA is increased, respectively 0.181 ± 0.005 and 0.283 ± 0.009 $\mu\text{mol/mL} \cdot \text{minute}$ to control mice and after induction of CSA. On histology epithelial cells showed a difference between control mice and mice induced CSA. Cell nucleus in rats induced CSA taper compared with control mice due to fibrosis.

Keyword: Protease activity, *Cyclosporine-A*, kidney, *Hematoxylin-Eosin*

PENDAHULUAN

Cyclosporine-A (CsA) merupakan imunosupresan yang berasal dari hasil fermentasi jamur *Tolypocladium inflatum* Gams. CsA biasanya digunakan untuk mencegah penolakan organ setelah transplantasi [1]. *Cyclosporine-A* merupakan peptida siklik netral yang memiliki 11 asam amino dan berat molekul 1,203 kDa. Sifat yang dimiliki CsA adalah hidrofobik, yang mampu berinteraksi dengan membran bilayer fosfolipid pada sel [2]. Penggunaan CsA tidak berbahaya bila pada dosis dan jangka waktu yang relatif pendek sesuai dengan kebutuhan, tetapi jika digunakan secara berlebihan dalam jangka panjang akan menyebabkan kematian sel pada ginjal karena CsA memiliki sifat nefrotoksik. Hal ini akan memicu terjadinya fibrosis

pada ginjal. Fibrosis merupakan jaringan fibrosa yang banyak mengandung serat kolagen akibat dari kerusakan sel-sel epitel pada tubulus dan glomerulus.

ROS merupakan proses pembentukan senyawa yang tidak sempurna akibat adanya pengalihan elektron [3]. Diduga ROS berperan terhadap terjadinya efek toksik yang memicu inflamasi pada ginjal. ROS yang berlebihan akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas yang ada didalam sel dan jaringan, proses inilah yang disebut stress oksidatif [4]. Stress oksidatif adalah keadaan yang tidak seimbang antara produksi ROS dengan anti oksidan baik enzimatis maupun non enzimatis [5]. Stress oksidatif pada jaringan inilah yang mengakibatkan nefrotoksitas. Hal ini yang akan mempengaruhi aktivitas enzim protease pada ginjal.

Protease merupakan salah satu enzim yang berperan dalam proses fagositosis terhadap benda asing dalam tubuh. Adanya pemaparan CsA secara kronis memicu protease melakukan fagositosis CsA. CsA mampu memicu terjadi ROS melalui mekanisme kerusakan protein dalam jaringan ginjal sehingga hal tersebut sangat mempengaruhi aktivitas protease dan gambaran histologi ginjal.

Oleh karena itu dalam penelitian ini perlu dikaji adanya pengaruh dari aktivitas protease dan gambaran histologi ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca induksi CsA.

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat bedah, seperangkat alat gelas, mortar, mikro pipet, penangas air, waterbath, appendof, lemari pendingin, pH meter digital (Inolab-WTW), seperangkat alat sentrifugasi (tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi) Denley tipe BR 401), inkubator (memmert), vortex (Guo-Huq), Sonikator (Branson 200), spektrofotometri UV, mikroskop cahaya (nikon BX-53), autoclaf, suntik, *hot plate*.

Bahan yang digunakan adalah ginjal tikus putih, pewarna HE, *Cyclosporine-A*, Tri Chloro acetic Acid, tirosin, kasein, HCl, KCl, KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄.H₂O, *Tween*, NaN₃ 1% . *Poly Methyl Sulfonyl Fluoride*, etanol absolut, Tris-HCl, KMnO₄, xilol, parafin.

Prosedur preparasi hewan coba

Preparasi hewan coba dilakukan selama empat minggu di laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Tikus yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan usia dua sampai empat minggu dengan berat 180-200 gram. Penggunaan hewan coba ini telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik

Penelitian Universitas Brawijaya No. 115-KEP-UB. Hewan coba dibagi menjadi dua kelompok yaitu: (1) Kelompok kontrol yaitu yang tidak mendapat perlakuan apapun sebanyak lima ekor tikus dan (2) Kelompok tikus yang diinduksi dengan CsA selama 21 hari sebanyak lima ekor. Setelah tikus beradaptasi dengan lingkungan kandang di laboratorium, dilakukan perlakuan sesuai dengan kelompok yang telah direncanakan. Dosis penggunaan CsA adalah 3 mg/kg berat badan tikus dengan volume 200 µl untuk masing-masing tikus. Injeksi dilakukan pada bagian subkutan secara kronis.

Pengambilan organ ginjal

Pengambilan organ ginjal pada hewan coba tikus putih dilakukan pada hari ke 22 dengan perlakuan sesuai dengan kelompok. Sebelum dilakukan pengambilan organ ginjal, terlebih dahulu hewan coba didislokasi pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian perut, dimana tikus diletakkan dengan posisi bagian perut diatas papan pembedahan. Kemudian diambil organ ginjal dan dipotong dengan menggunakan gunting bedah. Ginjal mula-mula dibilas dengan NaCl-fis 0,9% dingin. Kemudian ginjal sebelah kiri disimpan dalam larutan PBS-azida pH 7,4 dan disimpan dalam refrigerator sebagai bahan isolasi enzim protease. Sedangkan ginjal sebelah kanan dimasukkan dalam larutan PFA 10% untuk pembuatan preparat.

Isolasi protease

Organ ginjal ditimbang sebanyak 0,5 gram dan dipotong kecil-kecil dengan menggunakan gunting bedah, ditambah larutan PBS-Tween : PMSF (9:1) sebanyak 1 mL, ditambah sedikit pasir kuarsa, dan digerus dengan mortar dingin yang diletakkan diatas balok es. Setelah itu homogenat ditambah dengan larutan PBS-Tween : PMSF (9:1) sebanyak 2 ml dan dipindahkan kedalam tabung polipropilen yang telah disterilisasi dengan autoclaf. Kemudian dihomogenkan dengan alat getar vorteks selama 10 menit, disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Kemudian supernatan diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifugasi kembali selama 15 menit 10.000 rpm, endapan diambil dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah dengan larutan 0,02M Tris-HCl pH 6,5 dengan perbandingan 1:1 dan dilakukan homogenisasi.

Pengukuran aktivitas protease hasil isolasi dari ginjal

Langkah awal yaitu mencampurkan kasein 500ppm sebanyak 200 μ L, 300 μ L larutan buffer fosfat pH 7 dan 100 μ L enzim protease lalu didiamkan 60 menit pada suhu 37 °C diatas penangas air, ditambahkan 400 μ L larutan TCA 4% (b/c) didiamkan selama 30 menit pada suhu 27 °C lalu disentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil 100 μ L dan diencerkan lima kali volume sampel dengan buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansi pada λ_{maks} tirosin sebesar 275 nm. Blanko yang digunakan akuades.

Embedding ginjal

Langkah pertama embedding organ ginjal direndam dalam larutan formaldehid 10%, direndam dalam etanol 70% selama 24 jam, dipindahkan dalam etanol 80% selama dua jam, etanol 90% selama 20 menit, etanol 95% selama 20 menit dan etanol absolut selama 20 menit, dimana langkah ini dilakukan sebanyak tiga kali lalu dipindahkan organ ginjal pada larutan xilol selama 20 menit sebanyak 2 kali, dimasukkan kembali ke dalam larutan xilol dan dilakukan pada suhu 60-63 °C selama 30 menit. Lalu, organ ginjal dicelupkan dalam parafin cair yang telah dituang ke dalam wadah. Setelah beberapa saat parafin akan memadat dan organ ginjal berada dalam blok parafin.

Pembuatan preparat ginjal

Pembuatan preparat ginjal dilakukan dengan mula-mula memasukkan ginjal pada blok parafin hasil embedding sebelumnya pada penjepit mitokrom dan diatur sejajar dengan mata pisau mitokrom. Sebelum pemotongan, diatur terlebih dahulu ketebalan irisan diatas 10 μ m untuk mempercepat pencapaian bidang potong jaringan. Lalu, ginjal dipotong dengan ukuran 5 μ m, diambil irisan dengan kuas dan dimasukkan air pada suhu ruang. Berikutnya, dipindahkan hasil irisan dengan kuas ke dalam air hangat 38-40 °C dan diambil irisan yang terentang sempurna dengan objek gelas. Irisan yang terpilih dikeringkan, diletakkan di atas *hot plate* 38-40 °C hingga kering dan setelah itu preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40 °C selama 24 jam.

Pewarnaan hematoksilin-eosin

Pewarnaan Hematoksilin-Eosin pertama dilakukan dengan tahapan deparafinasi, dimana preparat dimasukkan dalam xilol bertingkat 1-3 masing-masing selama lima menit. Berikutnya, dilakukan tahapan rehidrasi preparat dimana preparat dimasukkan dalam etanol bertingkat yang dimulai dari etanol absolut 1-3, etanol 95, 90, 80, dan 70% masing-masing selama lima menit. Lalu, direndam dalam akuades selama lima menit. Setelah itu dilakukan

tahapan pewarnaan, dimasukkan preparat dalam pewarna hematoxylen hingga diperoleh hasil warna terbaik selama kurang lebih 10 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit, dibilas dengan akuades, dan dimasukkan dalam pewarna eosin selama 5 menit. Lalu, direndam preparat dalam akuades untuk menghilangkan kelebihan eosin. Berikutnya, dilakukan tahapan dehidrasi dengan preparat dimasukkan dalam seri etanol bertingkat dari 80, 90, dan 95% hingga etanol absolut 1-3. Selanjutnya, dilakukan *clearing* yaitu dengan memasukkan preparat pada xilol 1, 2 dan dikeringanginkan. Setelah itu, dilakukan mounting dengan entellan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas protease pasca induksi *Cyclosporine-A* (CsA)

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian CsA dengan dosis 3 mg/kg per berat badan tikus dapat menaikkan aktivitas protease sebesar 36,042%. Penggunaan CsA yang berlebih akan menstimulus produksi senyawa radikal bebas khususnya ROS (*Reactive Oxygen Species*) secara berlebihan. Berdasarkan pendapat Bobadilla dan Gerardo menyatakan bahwa CsA akan menunjukan sifat neprotoksik pada tikus model selama 20 – 28 hari setelah diinjeksi secara kronik pada bagian subkutan.

Tabel 1. Rataan Aktivitas Protease Hasil Isolasi dari Ginjal Tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Rataan aktivitas Protease ($\mu\text{mol/mL.menit}$)
Kontrol	$0.181 \pm 0,005$
CsA	$0,283 \pm 0,009$

Aktivitas protease yang berlebih akan merusak sel-sel pada ginjal. Sehingga ginjal akan mengalami disfungsi. Hal ini diakibatkan aktivitas protease meningkat dan memecah protein yang ada pada ginjal secara berlebih. Dimana semakin tinggi aktivitas protease maka semakin tinggi produksi ROS dalam ginjal. Produksi ROS yang berlebihan mampu mengakibatkan terjadinya inflamasi pada jaringan. ROS merupakan molekul yang terbentuk karena adanya reaksi reduksi pada oksigen (O_2) yang dapat bersifat radikal. Mekanisme kerusakan jaringan yang diakibatkan induksi CsA terjadi karena ROS mampu merusak lipid dan protein yang merupakan komponen utama penyusun sel dalam jaringan.

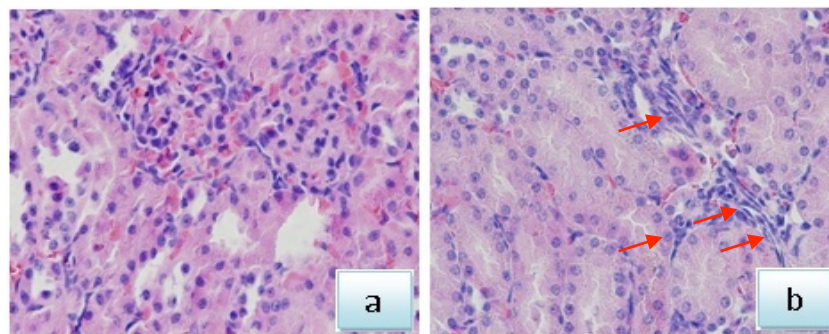
Sel inflamasi akan mensekresikan sitokin proinflamasi sehingga mengaktifkan neutrofil. Neutrofil yang teraktivasi akan memproduksi ROS dan melepaskan protease ke dalam sel dan

jaringan pada ginjal sebagai bentuk respon seluler. Proses fagositosis dapat menstimulasi produksi ROS secara berlebihan sehingga mengakibatkan inflamasi.

Perbedaan aktivitas protease ditentukan melalui uji statistika, yang menggunakan uji t. Pada percobaan ini didapatkan nilai $t_{hitung} = 8,069$ dan $t_{tabel} = 1,812$. Sehingga dapat disimpulkan aktivitas protease dua perlakuan tersebut *berbeda nyata* karena $t_{hitung} > t_{tabel}$.

Histologi ginjal tikus normal dan tikus pasca induksi *Cyclosporine-A* (CsA)

Kerusakan yang terjadi pada ginjal pasca induksi CsA terjadi pada sel epitel yang dapat diketahui melalui pewarnaan HE. Metode ini umumnya digunakan untuk mewarnai jaringan atau organ yang membutuhkan kontras antara sitoplasma dengan inti.



Gambar 1. Histologi ginjal tikus dengan perbesaran 600x (a) tikus normal (b) pasca induksi CsA 3 minggu (↑) EMT (*epithel mesenchymal transition*)

Hasil histologi di atas menunjukkan adanya perbedaan antara tikus kontrol normal dengan tikus yang mendapat perlakuan dengan *Cyclosporine-A*. Pada tikus kontrol (a) yang tidak diperlakukan dengan CsA menunjukkan gambaran histologi dari glomerulus dan jaringan atau sel-sel di sekitarnya masih bagus ditunjukkan banyak sel-sel epitel yang masih berinti. Sedangkan histologi organ ginjal terjadi pada tikus pasca injeksi CsA selama tiga minggu mengalami kerusakan yang ditunjukkan pada bagian glomerulus dimana terlihat sel epitelnya seperti robek atau lepas dengan sel epitel lainnya serta inti dari sel epitel yang hilang. Hasil tersebut menunjukkan adanya proses neprotoksik dari CsA yang menimbulkan sel-sel epitel pada organ ginjal mengalami apoptosis.

Proses apoptosis yang meningkat disebabkan adanya EMT (*epithel mesenchymal transition*) yang ditunjukkan dengan panah berwarna merah (↑). EMT adalah proses deferensial sel epitel normal menuju sel epitel yang memiliki motilitas atau sel fibrolas. Sel fibrolas ini akan berbentuk runcing. Sel fibrolas merupakan sel penghasil serat fibril atau kolagen yang dapat menyebabkan terjadinya fibrosis yang terbentuk di daerah ekstraseluler

sel pada ginjal sehingga menyebabkan gagal ginjal. Dengan demikian *Cyclosporine-A* dapat menginduksi fibrosis ginjal dalam kurun waktu tiga minggu.

KESIMPULAN

Induksi CsA pada ginjal dengan dosis 3 mg/kg berat badan tikus selama 3 minggu mampu meningkatkan aktivitas protease sebesar 36,042% dengan nilai aktivitas protease tikus control 0.181 ± 0.005 $\mu\text{mol/mL} \cdot \text{menit}$ dan tikus induksi CsA 0.283 ± 0.009 unit ($\mu\text{mol/mL} \cdot \text{menit}$). Pada gambaran histologi pasca induksi CsA mampu merusak jaringan sel pada ginjal sehingga ginjal mengalami fibrosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ditujukan kepada Dr. dr. Niniek Sumardi, Sp.PA atas kesempatan yang telah diberikan dan menjadi bagian dari payung penelitian dan Yulianto Muji Nugroho, S.Si yang telah banyak memberikan masukan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Borel F J, G Baumann, and T Beveridge. 1998. *Cyclosporine*. Sandoz Pharma Ltd. Basel. Switzerland.
2. Sarro E, O Tornavaca, M Plana, A Meseguer, and E Itarte, 2008. *Phosphoinositide 3-kinase Inhibitors Protect Mouse Kidney Cells from Cyclosporine-induced Cell Death. Kidney Int.* 73:77-85.
3. Murray, R. 2005. *Five Recent Abstract On Formaldehyde Damage to Cells Vitamin E and Selenium Protect*. Santa Fe New Mexico. USA.
4. Hancock, JT., R Desikin, and Neil SJ. 2001. *Biochemical Transaction*. Biochem. Soc. Trans 29:345-350.
5. Hudgson, F. 2004. *A Text Book of Modern Toxicology*. Their Ed. Wiley-Interscience. A John Wiley & Son Inc. Publication. P. 263-269
6. Bobadilla Norma A. and Gerardo Gamba. 2007. *New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity a role of aldosterone. Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biome'dicas*. Universidad Nacional Auto'nomade and Instituto Nacional de Ciencias Me'dicas y Nutricio'n S